[UCI]I804:24011-200000234363

2007년 8월
박사학위논문

대식세포주에서 박테리아성지질다당류 자극에 의한 분비백혈구단백분해효소억제제와 성장인자들의 발현

조선대학교 대학원

치 의 학 과

손 욱 희

2007년 8월 박사학위논문 대식세포주에서 박테리아성지질다당류 자극에 의한 분비백혈구단백분해효소억제제와 성장인자들의 발현 손 욱 희

대식세포주에서 박테리아성지질다당류 자극에 의한 분비백혈구단백분해효소억제제와 성장인자들의 발현

Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and growth factors induced by lipopolysaccharide stimulation in RAW264.7 macrophages

2007년 8월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

손 욱 희

대식세포주에서 박테리아성지질다당류 자극에 의한 분비백혈구단백분해효소억제제와 성장인자들의 발현

지도교수 황 호 길

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2007년 4월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

손 욱 희

손욱희의 박사학위 논문을 인준함

위원장 한림대학교 교수 이 윤 렬

위원 조선대학교 교수 김 흥 중

위원 조선대학교 교수 김 도 경

위원 조선대학교 교수 정 문 진

위원 조선대학교 교수 황 호 길

2007년 6월 일

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT ····· iv

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 실험재료 및 방법 ····· 3
1. 세포주와 배양 ····· 3
2. 역전사중합효소반응과 실시간 역전사중합효소반응 ····· 3
3. 항체제조 ····· 5
4. 면역학적 단백질 검출법 ····· 5
5. 면역침강법 ····· 6
6. 광학현미경 및 주사전자현미경적 관찰 ····· 6

Ⅲ. 실험결과 ····· 8
1. LPS 자극을 준 RAW264.7 세포에서 SLPI와 성장인자들의 mRNA 발현 ····· 8
2. LPS 자극을 준 RAW264.7 세포의 세포질과 배양액에서 SLPI 단백질 발현 ····· 8
3. LPS 자극에 따른 RAW264.7 세포의 형태학적 변화 ····· 9

Ⅳ. 총괄 및 고안 ····· 11

Ⅴ. 결 론 ····· 16

참고문헌 ····· 17
사진부도 설명 ····· 23

표 목 차

Table 1. The summary of PCR primer sequences, annealing temperatures and amplification cycles ····· 4

도 목 차

Fig. 1. Nucleotide sequence of the mSLPI cDNA ····· 25

Fig. 2. Amino acid sequence of mSLPI ····· 26

Fig. 3. RT-PCR assay of the SLPI and growth factor mRNAs ····· 27

Fig. 4. SLPI protein levels by LPS treatment in RAW264.7 cells ····· 29

Fig. 5. Observation of morphology after LPS stimulation in RAW264.7 cells ····· 30

Fig. 6. Diagram of conclusions ····· 31

ABSTRACT

Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and growth factors induced by lipopolysaccharide stimulation in RAW264.7 macrophages

Son, Wook-Hee
Advisor : Prof. Hwang, Ho-Keel, D.D.S., M.S.D., Ph.D.
Department of Dentistry,
Graduate School of Chosun University

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) was known that bacterial lipopolysaccharide (LPS)-induced product of macrophage. Macrophages play an important role in the development of inflammatory responses by secreting an array of cytokines and chemokines in a tissue microenvironment. To identify the function and relationship between potent growth factors and SLPI after LPS stimulation, The reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blots were performed for the detection of mRNA and protein expression of SLPI and growth factors such as VEGF (vascular endotherial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) after 100ng LPS stimulation on the RAW264.7 cells. The result of RT-PCR was showed SLPI mRNA expression was increased from 60 min to 48 h after incubation with LPS in RAW 264.7 cells. VEGF and PDGF mRNA was expressed highly at

initial stage by LPS stimulation. The expressions of bFGF and collagen type I mRNAs showed very weakly after LPS treatment. SLPI protein level was increased likely the mRNA levels in lysates after LPS stimulation. Additionally, the phase contrast and scanning electron microscopic observation showed that the LPS induce the change of morphology of the RAW264.7 cells. From these results, it suggests that the secreted SLPI by LPS treatment may associate with VEGF and PDGF expression in RAW264.7 cells.

Ⅰ. 서 론

박테리아성지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)는 면역계를 유발시키는 물질 중 하나이며, LPS에 대한 대식세포의 사이토카인(cytokine)이나 성장인자의 분비반응은 감염으로부터 개체를 보호할 수 있지만, 반응이 과다할 경우 과민성 염증반응 증상을 유발하며 이는 개체 자체에 심각한 손상을 줄 수 있다[1]. 또한 많은 종류의 포유류 세포들은 저산소증(hypoxia)이나 염증반응 같은 비 정상적인 세포주변 환경에서 성장인자나 사이토카인을 분비할 수 있다[2]. 이러한 상황에서 분비되는 성장인자들로는 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 섬유모세포 성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF) 및 혈소판유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)등이 있다[3-5]. 혈액에서 LPS는 혈청 단백질인 LPS 결합단백질과 결합한다. 중성구, 단핵구, 면역구, 대식세포의 세포표면에서 LPS는 CD14 과 Toll-like receptor 4(TLR4)와 결합하여 염증에 관여하는 사이토카인과 TNF-α, IL-1, IL-6, 단백분해효소, 그리고 NO 등을 분비한다. 사이토카인의 과도한 형성은 endotoxic shock cascade의 발생에 중요한 영향을 미치며, neutrophil elastase와 catepsin G 같은 단백분해효소도 LPS에 의해서 유발된 endotoxin shock에 관여한다[6-8]. 또한 염증반응을 유도하기 위한 LPS의 농도는 다양한 인자들의 발현에 차이를 나타낸다[9].

분비백혈구단백분해효소억제제(secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)는 11.7-kDa의 크기를 가지는 시스테인 잔기가 풍부한 단백질로서, 침샘, 정장, 자궁경부 그리고 비강 및 기관지 점액 층에 있는 상피세포 에서 분비된다. SLPI는 *in vitro* 상에서 상처 치유와 세포 증식을 촉진하고 HIV 바이러스나 세균 감염을 방해하는 기능도 가지고 있다[10]. 그리고 최근에는

SLPI 가 암 세포 전이의 원인이 되는 인자라는 보고도 있었다[11]. 또한 SLPI는 LPS에 의해 자극된 대식세포에 의해서 분비되어 LPS에 의해 활성화된 염증반응에 관여하는 신호전달 인자들에 대한 길항작용을 한다[12-14].

치주조직 염증의 대부분은 구강내 세균에 의해 점진적으로 진행되며, 과도한 염증반응은 치주조직의 재생을 저해하는 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다[15]. 따라서 염증반응을 단시간에 제어할 수 있는 생물학적 관련물질의 발현과 기능의 규명은 치주염증을 포함한 여러 질환에서 필수적이라 볼 수 있다. 또한 염증인자에 민감하게 반응하는 대식세포에 처리하는 LPS의 다양한 농도의 차이는 SLPI 뿐만 아니라 성장 인자들의 발현에도 영향을 끼칠 수 있는 중요한 요소이다. 이에 본 연구에서는 염증반응에 민감한 대식세포주인 RAW264.7 세포를 이용하여 프로사이토카인으로서 작용할 것으로 생각되는 SLPI와 VEGF, bFGF, PDGF 등 몇 가지 성장인자 및 세포 외부기질이 SLPI 발현의 적정농도인 LPS에 반응하여 발현하는지를 규명하고, 또 그 기능을 유추하고자 하였다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 세포주와 배양

RAW264.7 세포주는 2×10^5 수로 60mm dish에 각각 배양하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM; Gibco BRL, USA)에 10% fetal bovine serum, 100-units/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 0.25mg/ml amphotericin B 그리고 1X non-essential amino acid solution을 첨가하여 사용하였고, 37℃가 유지된 5% CO_2 배양기에서 세포를 배양하였다.

2. 역전사중합효소반응*(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)*과 실시간 역전사중합효소반응*(Real-Time PCR)*

RAW264.7 세포를 ml 당 100ng의 LPS(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 30분, 60분, 90분, 24시간 및 48시간 동안 각각 노출시켰다. 그리고 Tri Zol® reagent(MRC Inc., Montgomery Rd, CIN, USA)를 이용하여 각각으로부터 총 RNA를 추출하였다. Superscript one-step reverse transcriptase (Invitrogen, USA)는 추출한 총 RNA 로부터 cDNA를 합성하기 위해 사용되었고, Ex Taq polymerase(TaKaRa Korea, Seoul, KOR)를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 모든 PCR 반응에서 초기 변성 온도와 마지막 신장 온도는 각각 94℃ 5분과 72℃ 5분으로 하였다. 각 유전자의 forward 와 reverse 프라이머의 결합 온도와 증폭 수 그리고 생산된 유전자의 크기는 Table 1에 나타내었다. SLPI 프라이머는 전체 SLPI 유전자 서열 중 신호펩타이드 부위

와 3'의 비 해독 부위를 포함시켜 제작하였다(Fig. 1). PCR 반응 후 생산물은 ethidium bromide(EtBr)가 첨가된 1.5% 아가로스 겔에 전기영동 후 UV를 조사하여 확인하였다. 전기영동을 통한 PCR 생산물의 양은 시각화된 밴드의 밀도를 통해 정량 하였다. 각 밴드의 밀도 측정은 Science lab Image Gauge(FUJI FILM, JPN) 프로그램을 이용하여 수행하였다.

Table 1. The summary of PCR primer sequences, annealing temperatures and amplification cycles

Gene	5' Forward	3' Reverse	Temp (℃)	Cycle	Size
mSLPI	5'-CGGAATTCCAGAGCTCCCCTGCCTTC-3'	5'-GCTCTAGACATAGAGAAATGAATGCGTTT-3'	63	30	676bp
mVEGF	5'-GTGGACATCTTCCAGGAGTA-3'	5'-ATCTGCAAGTACGTTCGTTT-3'	60	35	382bp
mPDGF-BB	5'-CTCTTGACTCCAAGAACCTG-3'	5'-AATCCATCAGAGAAGGTGTG-3'	48	33	582bp
mbFGF	5'-GGCTTCTTCCTGCGCATCCA-3'	5'-GCTCTTAGCAGACATTGGAAGA-3'	53	35	354bp
mGAPDH	5'-CCATGGAGAAGGCTGGG-3'	5'-CAAAGATGTCATGGATGACC-3'	55	35	199bp

또한 RAW264.7 세포에 LPS 자극을 준 후, SLPI mRNA의 발현 양상을 정량적으로 분석하기 위하여 real-time PCR을 수행하였다. 총 RNA는 TRI reagent를 사용하여 추출하였고, RNA 양은 UV spectrophotometer (Amershamphamacia, UK)를 이용, RNA 시료당 1ug으로 정량 하여 사용하였다. Real-time PCR을 위한 프라이머는 각각 forward : 5'-GCCCGGGAAAGCAGAGGTG-3', reverse : 5'-ACATTGGGAGGGTTAAG CATCATACAT-3'로 제작하였다. 정량 후 총 RNA는 500ng의 oligo-dT(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 Superscript III reverse transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Real-Time PCR 반응 조건은 95℃ 15분, 95℃ 15초, 60℃ 15초, 72℃ 15초이고 반응 횟수는 40회로서 ExicyclerTM(Bioneer, KOR)을 이용하여 수행하였다. 반응 동안 나타나는 형광 값을 알아보기 위해 반응액에는 1×

농도로 SyberGreen(Bioneer, KOR)을 첨가하였으며, 총 반응 양은 20μl로 조절하였다.

3. 항체제조

EGGKNDAIKIGAC 펩타이드는 생쥐 SLPI(mSLPI) 단백질의 폴리펩타이드 부분 에서 선택하였다(box in Fig. 2). 선택한 SLPI 펩타이드는자동 펩타이드 합성기에 의해서 제조되었다(Takara, Inc., KOR). 합성한 SLPI 펩타이드항체 용액은 항체 제작을 위해 토끼의 림프절에 주입해 첫 번째 면역 반응을 일으켰고, 3주 후에 두 번째 면역반응을 수행 하였으며 10일 후, 세 번째 면역반응을 거치고 난 뒤 20일 후에, 친화성 크로마토그래피 방법을 이용하여 생성된 SLPI 항체를 정제하였다.

4. 면역학적 단백질 검출법*(Western blotting)*

세포질 내에 있는 SLPI 단백질 발현을 분석하기 위하여 면역학적 단백질 검출 방법을 사용하였다. 150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris-Cl(pH 7.4), 2 mM Na_3VO_4, 2mM $Na_4P_2O_7$, 50mM NaF, 2mM EDTA(pH 7.4) 및 단백질분해효소 억제제인 leupeptin과 aprotinin을 첨가한 NP-40 용해완충액(lysis buffer)을 이용하여 세포의 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 30 mg씩 각각 같은 양을 정량 하여 실험에 사용 하였고 SDS 15 %-polyacrylamide 겔을 이용 전기영동을 통해 단백질을 분리해 냈다. 분리한 단백질은 nitrocellulose 막으로 이동 시킨 후, 5% skim milk를 이용하여 blocking 시켰고, anti-rabbit SLPI 항체(1 : 500)를 넣고 다음날까지 반응시켰다. 다음으로 세척 후 HRP (horseradish-peroxidase)가 붙어있는 goat-anti-rabbit 2차 항체(1 : 10,000,

SantaCruz Biotchnology, USA)를 처리하고 ECL (Amershamphamacia, UK)을 이용하여 발색시킨 후 현상하였다. 현상 후 나타난 단백질 밴드는 Science Lab Image Gauge(FUJI FILM, JPN) 프로그램을 이용, 각 밴드의 밀도를 측정하여 정량하였다.

5. 면역침강법*(Immunoprecipitation)*

LPS 처리 후 분비된 SLPI 단백질의 양을 알아보기 위하여 면역침강법을 사용하였다. Protein G agarose bead들을 phosphate buffered saline (PBS)으로 3번 세척 후 500 ml의 배양액과 섞어 주었다. 1시간 동안 반응 후 SLPI 항체를 넣고 다음날까지 4℃에서 반응시켰다. 반응 후 단백질-bead-항체결합체(immunoprecipate)는 PBS를 이용하여 세척하고, 10,000 x g에서 5분간 원심분리를 수행하였다. 이러한 단백질-bead-항체결합체에 SDS-PAGE용 sample buffer을 첨가한 후 5분간 끓여 주었다. 이후 과정은 western blotting 방법을 이용하였다.

6. 광학현미경 및 주사전자현미경적 관찰

LPS 자극에 각각 30분, 60분, 90분, 24시간, 48시간씩 노출된 RAW264.7 세포의 형태학적 변화를 알아보기 위하여 위상차 현미경(Olympus, JPN)을 이용하여 관찰 하였다. 또한 LPS 처리 후 세포의 미세구조를 관찰하기 위하여, 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM) 방법을 이용하였다. 주사전자현미경관찰을 위하여 LPS 처리 후 RAW264.7 세포를 PBS에 희석한 2.5 % glutaraldehyde에 1차 고정 후 osmium tetraoxide(OsO_4)를 이용하여 2차 고정을 수행하였다. 그 후 고정된 세포를 PBS로 세 번 세척하고 70%, 80%,

90%, 95% 그리고 마지막으로 100% 에탄올을 순차적으로 처리해 주면서 수분을 완전히 제거하였다. 그 다음 hexamethyldisilazane(HMDS, Sigma)을 첨가하여 시료를 완전하게 건조시켰다. 준비된 시료들은 금입자 증착기로 표면을 처리한 후, 주사전자현미경(Hitach, H4700, JPN)을 이용하여, 15Kv에서 관찰하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. *LPS* 자극을 준 *RAW264.7* 세포에서 *SLPI*와 성장인자들의 *mRNA* 발현

RT-PCR 실험결과 100ng의 LPS 처리를 한 RAW264.7 세포에서 SLPI mRNA의 발현은 대조군 수준에 비해 60분 대에서 1.6배 증가하였고 시간대에 따라 점점 증가 하였다. 그리고 VEGF mRNA는 대조군에 비해 30분대와 60분대에 각각 1.7배씩 증가하였고 이후로는 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 PDGF mRNA 는 30분과 60분에 각각 1.4배씩 증가 하였고 이후로는 감소하는 경향을 나타냈다. 그리고 bFGF는 90분대 까지는 거의 발현을 하지 않다가 24시간에 약한 발현 양상을 보였다. 제 I형 아교질 mRNA는 24시간과 48시간대에 매우 약하게 발현하였다(Fig. 3A, 3B). SLPI mRNA의 정량을 측정한 Real-time PCR 결과는 RT-PCR 결과와 동일하게 30분대에서 부터 24시간대 까지 증가였으나, 48시간대에서는 감소하였다(Fig. 3C). 일정한 발현 수준을 보여주는 GAPDH mRNA는 PCR 분석을 위한 내부 대조군으로 사용하였다.

2. *LPS* 자극을 준 *RAW264.7* 세포의 세포질과 배양액에서 *SLPI* 단백질발현

RAW264.7 세포에서 LPS 자극에 따른 SLPI 단백질의 발현양상을 알아보기 위하여 세포질 용해액과 세포 배양액을 이용하여 Western blot을 수행하였다. 그 결과 세포질 용해액에서 SLPI 단백질 발현은 60분대에서 증가하기 시작해 24 시간대에서 가장 많이 발현 하였고 (대조군세포 대비 1.7배)

48시간에는 24시간대에 비해 감소하였다. 하지만 이것은 대조군 발현 수준에 비하여 1.47배 증가한 양이며 LPS자극에 의한 SLPI 단백질의 발현은 전체적으로 증가하는 경향을 나타냈다. 따라서, 이러한 결과는 SLPI 단백질 역시 상기의 RT-PCR 및 Real-time PCR 결과와 마찬가지로 LPS 자극에 의하여 세포 내 발현 양이 증가함을 나타낸다. 또한 LPS 자극 후 면역침강방법을 이용하여 세포 배양액 내에 있는 SLPI 단백질의 양을 알아 보았다. 실험 결과 SLPI 단백질의 양은 60분 까지 일정한 양상을 보이다가 90분부터는 점진적으로 감소하는 경향을 나타냈다 (Fig. 4A, 4B)

3. LPS 자극에 따른 *RAW264.7* 세포의 형태학적 변화

RAW264.7 세포에 LPS 자극을 준 후 위상차 현미경을 이용하여 관찰한 결과 LPS를 처리하지 않은 세포(Fig. 5A-①) 에서는 구형에 가까운 모습을 나타냈으나 LPS 처리 후 30분(Fig. 5A-②)부터 방추형의 모양을 가지는 세포들이 보이기 시작했다. 60분(Fig. 5A-③) 에는 30분대에 비하여 방추형 및 길게 뻗은 형태의 세포 모양을 나타냈고, LPS 자극 후 90분(Fig. 5A-④)부터는 방추형 모양의 세포들과 수직 및 수평 방향으로 길게 뻗은 모습의 세포들이 더욱 많이 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 LPS 자극 후 24시간 및 48시간이 지난 군(Fig. 5A-⑤, ⑥)에서는 대조군에 비해 세포질 쪽에서 뻗어 나온 돌기를 가진 세포가 관찰되었다. 그리고 전체적인 세포의 숫자는 60분까지 증가하는 양상을 보이다가 90분부터 그 양이 조금씩 감소하는 것을 확인할 수 있었다. LPS에 의해 자극된 RAW264.7 세포의 세포질 미세구조를 알아보기 위하여 주사전자현미경 관찰을 한 결과 LPS를 처리하지 않은 대조군 세포는 위상차 현미경 결과와 마찬가지로 원형에 가까운 모습을 보였고 세포질은 전체적으로 매끈한 모습을 보였다. 그에 반해 LPS 처

리 후 30분부터 RAW264.7 세포의 세포질은 바깥쪽을 향해 좀 더 확장된 모습을 보였으며(Fig. 5B-②), 이로부터 많은 세포 돌기들이 형성된 모습이 관찰되었다. LPS 자극 후 60분이 지난 세포에서는 전체적인 세포의 숫자가 늘어났으며, 세포질의 확장 및 세포 돌기의 수도 대조군 및 30분과 비교하여 확연히 늘어남을 관찰할 수 있었다(Fig. 5B-③). 90분 이후 48시간 까지는 유사한 형태적인 특징이 확인되었다(Fig. 5B-④, ⑤, ⑥).

Ⅳ. 총괄 및 고안

SLPI는 대표적인 세린 계열의 단백질분해효소억제제로서 중성백혈구에서 기원하는 elastase와 cathepsin G 뿐만 아니라 비만세포와 췌장샘꽈리세포에서 기원하는 chymase 와 tryptase 및 trypsin과 chymotrypsin 을 효과적으로 억제한다고 알려져 있다[14,16,17]. 또한, SLPI는 지라부착세포, 복막대식세포, 골수유래 대식세포주 그리고 복막다형핵백혈구와 같은 염증반응 세포들에서 주로 발현 한다고 알려져 있다[1]. 대식세포는 조직 내에서 사이토카인과 케모카인(chemokine)을 분비함으로써 염증반응의 진행에 중요한 역할을 한다. 예를 들어 IL-1(interleukin-1)과 TNF-α(Tumor necrosis factor-α)와 같은 전염증반응사이토카인(pro-inflammatory cytokine)들은 대식세포를 활성화 시키고 다른 사이토카인이나 케모카인들의 발현을 증가시킨다[18]. 염증반응과 관련된 물질들은 외부로부터의 감염에 대해 자신을 보호하기 위하여 만들어지지만 이것이 과다하게 분비될 경우 전신적 염증반응의 원인이 되어 오히려 숙주에 치명적인 영향을 줄 수 있다[19,20]. SLPI는 LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포에서 IL-10(interleukin-10)과 전환성장인자-β(transforming growth factor-β, TGF-β)와 같은 항염증사이토카인의 발현을 증가시킨다고 알려졌다[21].

대식세포는 LPS 자극의 정도에 따른 사이토카인과 매개체들을 분비함으로서 염증반응과 비특이적 면역반응에 관여한다고 알려졌으며[22], 대식세포는 SLPI를 발현하고 있으며 LPS의 자극에 의해서 증가한다고 하였다[23]. 따라서 본 연구에서는 이전 실험에서 대식세포에 사용된 LPS의 50mg/ml 보다 낮은 농도인 100ng/ml로 대식세포주인 RAW264.7 세포에 처리하여 SLPI와 다른 성장인자들의 발현을 측정하였다. RT-PCR 결과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서도 약한 발현이 확인되었으며, LPS 처리 후에는 60분부터 SLPI mRNA

발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 100ng보다 더 낮은 농도인 1ng과 10ng의 농도로 LPS를 처리한 실험에서 SLPI의 발현이 증가된 시기는 90분 이후의 시기인 것으로 미루어 염증매개 물질로서 SLPI 발현증가의 적정농도는 100ng인 것으로 생각된다. 또한 SLPI는 자궁내막 상피세포에서 세포 성장 및 증식과 관련된 유전자들의 발현에 영향을 끼친다고 알려져 있는데[24], 본 실험에서 RT-PCR, Real-time PCR, 결과 LPS를 처리하지 않은 상태에서도 SLPI mRNA의 약한 발현 양상을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 SLPI가 세포증식이나 단백질 분해억제의 기능과 같은 세포 내 외부적 환경요인의 자극에 반응하기 때문인 것으로 생각되나 이는 추후에 보완되어야 할 것으로 사료된다.

또한 본 연구에서는 SLPI 단백질의 발현을 알아보기 위하여 LPS 자극을 준 RAW264.7 세포질 용해액과 배양액을 이용하여 Western blot을 수행하였다. 흥미롭게도 세포내 SLPI 단백질은 mRNA의 발현 증가시기와는 차이가 나는 시간대인 24시간에서 증가된 것으로 확인되었다. 이전에 수행되었던 섬유모세포주인 NIH3T3 세포를 이용한 LPS 반응에 대한 세포내 단백질 발현 증가의 결과와 비교해 보면 mRNA의 발현에서는 차이를 보이지 않았지만 단백질 수준에서는 24시간대에서 증가했던 것을 보면[25], 단백질의 발현은 전사 후 단계에서 조절되며 특히 SLPI는 분비단백질이므로 차이를 보이는 것으로 생각된다.

VEGF는 혈관생성에 관여하는 주요 조절물질들 중 하나로써 대식세포에 의해 일어나는 혈관생성에서도 중요한 역할을 하며, 활성화된 대식세포는 염증 반응 시 여러 신생 혈관생성 인자들을 분비 한다[26,27]. 또한 VEGF는 LPS와 난소성 스테로이드에 의해 그 발현이 증가한다고 알려져 있으며 자궁내막증 환자의 복막 대식세포에서도 발현된다고 알려졌다[28]. 이러한 실험결과들은 활성화된 대식세포가 VEGF의 분비를 통해 혈관생성 및 침투에 일부분 관여한다는 것을 시사한다[29]. 또한 치수세포에서는 LPS의 농도와는 상관

없이 VEGF의 mRNA가 발현됨으로서 치수혈관 생성인자 뿐만 아니라 박테리아의 침입으로부터 보호하는 역할을 한다고 하였다[9]. LPS의 농도를 20mg으로 RAW264.7 세포에 처리한 실험에서 VEGF mRNA의 발현은 일정하게 나타났는데[9], 이 결과는 본 연구에서 LPS 자극 후 초기 30분과 60분에서 강한 발현을 보인 것과는 차이가 있는 것으로서 LPS의 적정 농도는 SLPI 뿐만 아니라 성장인자들의 발현에도 영향을 끼칠 수 있는 요소라 생각되며 활성화된 대식세포에서 초기에 VEGF의 발현이 증가함으로서 염증반응 및 그에 따른 혈관생성촉진 인자로써 작용할 것으로 생각된다.

PDGF는 대표적인 유사분열 성장인자로서 혈소판, 단핵구, 외배엽성간엽세포, 그리고 혈관평활근세포와 같은 여러 세포에서 발현한다. 단핵구와 대식세포는 죽상경화증(atherosclerosis) 시 일어나는 염증반응에서 매우 중요한 역할을 하며, 단핵구는 혈관평활근세포 표면에 있는 해당 수용체에 결합을 하고 이때 단핵구가 분비한 PDGF가 일련의 작용을 통해 혈관평활근세포로부터 단핵구를 대식세포로 분화시키는 물질을 분비하도록 한다[30,31]. PDGF는 잇몸조직의 주머니 상피조직에서 염증반응시 증가하여 치주질환 과정에서 염증반응의 변화에 기여한다고 하였다[32]. 본 연구에서 PDGF의 발현 양상은 VEGF와 유사하게 초기에 증가 하였는데 이는 염증 반응 시 혈관으로부터 유입되는 단핵구를 대식세포로 분화 유도하기 위한 것으로 생각되나 이는 추후에 보완 실험이 필요할 것으로 생각된다.

RT-PCR 결과로 SLPI와 VEGF 그리고 PDGF 유전자의 관계를 보면 SLPI는 LPS 처리 후 60분에 증가하기 시작하여 48시간까지 발현 수준이 점점 높아졌고, VEGF와 PDGF 유전자는 그보다 먼저 증가하기 시작했다가 60분까지 발현 수준을 유지했고 그 이후에는 급격히 감소하는 경향을 보였다. SLPI는 아마도 자가분비(autocrine) 방법을 통해 대식세포에 의한 염증반응을 조절할 것이라는 보고로 미루어 보아[23], VEGF나 PDGF의 발현은

SLPI가 프로사이토카인으로 작용함으로서 이 두인자를 조절에 관여 할 것이라고 생각되지만 이 부분 은 SLPI 단백질을 처리한 후 두인자의 발현을 확인해야 하는 추가실험이 필요할 것으로 생각된다.

*In vivo*에서 bFGF는 신생혈관생성과정과 과립조직형성을 촉진한다고 알려 졌으며[33], 내피세포로부터 bFGF의 생산과 분비는 IFN-α+(interferone-α+), IL-2(interleukin-2), IL-1β(interleukin-1β) 그리고 nitric oxide(NO)와 같은 전염증사이토카인 들에 의해 촉발되는 것으로 밝혀졌다[34,35]. 또한 대식세포[36,37], CD4+ 와 CD8+ T 림프구[38,39] 같은 염증반응 세포들도 bFGF를 분비하는 것으로 알려졌다. 본 연구에서도 RT-PCR 결과 LPS 자극에 의한 bFGF의 발현을 볼 수 있었지만 자극 후반부에만 약하게 발현하였다. 따라서 본 실험에 사용된 LPS의 농도가 낮은 것으로 생각되지만 bFGF의 발현은 LPS가 아닌 살아있는 세균에 직접 감염 시켰을 때 발현을 촉진시켰고 또한 세균의 수와 감염 시간에 따라 그 발현 양에 차이를 보인다[40]는 결과로 미루어 LPS의 농도와는 무관한 것으로 확인되었다.

아교질은 세포외 기질에서 가장 중요한 섬유성 구성 요소이다. 그 중 제 I 형 아교질은 우리 몸 전체에 걸쳐 세포외 기질의 중요한 구조적 요소로서 결합조직, 내부장기기관, 피부, 근육, 뼈 등 대부분의 조직에서 발견된다. 그런데 LPS 자극이나 zymosan을 처리했을 시 대식세포는 주로 아교질 분해효소를 분비하는 것으로 알려졌다[41,42]. 흥미롭게도 본 연구에서 LPS 처리 후 24시간과 48시간에서 아교질 mRNA가 미약하게 발현된 것으로 보아 조직 붕괴나 염증과정 중 세포외 기질의 조절에 관여할 것으로 보이나 추후에 LPS의 농도를 높인 후 확인해야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서 RAW264.7 세포에서 SLPI 발현을 유도하는 LPS의 적정농도라 생각되는 100ng에서도 세포형태의 변화가 있는지를 확인하기 위하여 현미경을 이용하여 세포의 형태적인 변화를 관찰하였다. 위상차 현미경과 주사

전자현미경을 이용한 관찰 결과는 이전에 보고된 필로포디아(filopodia 또는 microspike)와 같은 돌기와 세포질 부위가 확장되고 세포질 돌기가 나타나는 특징과 동일하였다[43,44]. 그러나 이러한 연구들은 대부분 고농도의 LPS(50mg 이상)를 처리한 후 관찰한 것으로 100ng의 LPS처리 군과 비교 했을 때 필로포디아나 세포질 돌기의 수가 상대적으로 많았으며, 세포의 변형도 심한 차이를 보였다.

따라서 SLPI 발현증가의 적정 농도라 생각되는 100ng의 LPS에 의해서 발현되는 VEGF나 PDGF는 SLPI가 프로사이토카인으로 작용함으로서 이 두인자의 조절에 관여할 것으로 사료된다.

V. 결 론

분비백혈구단백분해효소억제제(SLPI)와 여러 성장인자들은 상처 감염이나 박테리아 침입 시 일어나는 염증반응과 서로 관계가 있지만, 대식세포에서 LPS 자극시 SLPI와 VEGF, bFGF, PDGF 등과 같은 성장 인자들의 발현관계에 대해서는 아직까지 알려진 바 없다. 따라서 본 연구는 대식세포 세포주 RAW264.7 세포에 SLPI 발현의 적정농도인 LPS에 반응하는 SLPI 및 성장인자들과 세포외부기질의 발현을 규명하고자 하였다.

역전사효소중합반응(RT-PCR)과 면역학적 단백질 검출법(Western blotting)은 LPS 처리 후 SLPI와 몇몇 성장인자들(VEGF, bFGF, PDGF)및 제 1형 아교질 mRNA와 SLPI 단백질의 검출을 위해 각각 수행하였다. RAW264.7 세포주를 ml 당 100ng 의 LPS 에 각각 30분, 60분, 90분, 24시간, 48시간 동안 노출시켰다.

RT-PCR 결과, SLPI mRNA는 시간이 지남에 따라 점점 발현 양이 증가하였고 VEGF와 PDGF mRNA는 초기에 높은 발현 양상을 보였다. 그러나 bFGF와 I형 아교질의 발현은 매우 미약하게 나타났다. SLPI 단백질 발현 역시 mRNA 수준과 마찬가지로 증가하는 양상을 보였으며, 배양액 내의 SLPI 단백질양은 전체적으로 감소하는 경향을 보였다. 또한 광학현미경 관찰과 주사전자현미경 관찰결과, LPS가 RAW264.7 세포주의 형태학적 변화를 유도함을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Jin F, Carl N, Danuta R, Aihao D (1997). Secretory leukocyte protease inhibitor: A macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. Cell 48:417-426.
2. Jeffrey RJ, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD (1997). The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. FASEB J 11: 457-465.
3. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246:1306-1309.
4. Slavin J (1995). Fibroblast growth factors At the heart of angiogenesis. Cell Biol Int 19:431-444.
5. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C (1994). Macrophages and angiogenesis. J LeukBiol 55:410-422.
6. Underhill DM, Ozinsky A (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Curr Opin Immunol 14:103 - 110.
7. Medzhitov R (2001). Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol 1:135 - 145.
8. Tkalcevic J, Novelli M, Phylactides M, Iredale JP, Segal AW, Roes J (2000). Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. Immunity 12:201-210.
9. Botero TM, Mantellini MG, Song W, Hanks CT, Nör JE (2003). Effect of lipopolysaccharides on vascular endothelial growth factor expression in mouse pulp cells and macrophage. Eur J Oral Sci 111:228-234.

10. Laurie RG, Audrey LA, Diane CS (2002). Construction,non-denaturing affinity purification, and characterization of baculovirally expressed human secretory leukocyte protease inhibitor. Prot Exp & Purif 26:179-186.
11. Nick D, Gholamreza HG, Jing Z, Lea B, Patrick de B, Hilde R (2003). Secretory leukocyte protease inhibitor promotes the tumorigenic and metastatic potential of cancer cells. Proc Natl Acad Sci 100:5778-5782.
12. Abe T, Kobayashi N, Yoshimura K, Trapnell BC, Kim H, Hubbard RC, Brewer MT, Thompson RC, Crystal RG (1991). Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. J Clin Invest 87:2207 - 2215.
13. Fritz H (1988). Human mucus proteinase inhibitor (human MPI). Human seminal inhibitor I (HUSI-I), antileukoprotease (ALP), secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI). Biol Chem Hoppe-Seyler 369:79 - 82.
14. Ohlsson K, Bergenfeldt M, Bjork P (1988). Functional studies of human secretory leukocyte protease inhibitor. Adv Exp Med Biol 240:123 - 131.
15. Love RM, Jenkinson HF (2002). Invasion of dental tubules by oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med 13(2):171-183.
16. Fink E, Nettelbeck R, Fritz H (1986). Inhibition of mast cell chymase by eglin c and antileukoprotease (HUSI-I). Indications for potential biological functions of these inhibitors. Biol Chem Hoppe-Seyler 367:567 - 571.
17. Thompson RC, Ohlsson K (1986). Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. Proc Natl Acad Sci 83:6692-6696.

18. Matsuyama W, Wang L, Farrar WL, Faure M, Yoshimura T (2004). Activation of discoidin domain receptor 1 isoform b with collagen up-regulates chemokine production in human macrophages: role of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappa B. J Immunol 172: 2332-2340.
19. Bone RC (1991). The pathogenesis of sepsis. Ann Intern 115:457-469.
20. Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S, Old LJ (1997). Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 94:8093 - 8098.
21. Sano C, Shimizu T, Sato K, Kawauchi H, Tomioka H (2000). Effects of secretory leucocyte protease inhibitor on the production of the anti-inflammatory cytokines, IL-10 and transforming growth factor-beta (TGF-b), by lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Clin Exp Immunol 121:77 - 85.
22. Kaoru T, Teruo K, Masayasu N (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-induced IL-6 production by embryonic fibroblasts isolated and cloned from LPS-responsive and LPS-hyporesponsive mice. Mol Immun 34:16-17.
23. Jin F, Carl FN, Danuta R, Aihao D (1998). Lipopolysaccharide-related stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor. Infection and immunity 66 :2447-2452.
24. Zhang D, Simmen RC, Michel FJ, Zhao G, Vale-Cruz D, Simmen FA (2002). Secretory leukocyte protease inhibitor mediates proliferation of human endometrial epithelial cells by positive and negative regulation of

growth-associated genes. J Biol Chem 277:29999-30009.

25. Lee SH, Choi BD, Jeong SJ, Jang HS, Kim BO, Lim DS, Park JC, Wang G, Jeong MJ (2006). Increased protein of the secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and the expression of growth factors in NIH3T3 cells by LPS stimulation. Kor J Electron Micros 36(3):165-172.
26. Folkman J, Klagsbrun M (1987). Angiogenic factors Science 235: 442-447.
27. Polverini PJ (1998). The patholophysiology of angiogenesis. Crit Rev Oral Biol 6:230-247.
28. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Muller KH, Sharkey AM, Smith SK (1996). Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. J Clin Invest 98:482-489.
29. Perez-Ruiz M, Ros J, Morales-Ruiz M, Navasa M, Colmenero J, Ruiz-del-Arbol L, Cejudo P, Claria J, Rivera F, Arroyo V, Rodes J, Jimenez W (1999). Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. Hepatology 29:1057-1063.
30. Reddy MA, Kim YS, Lanting L, and Natarajan R (2003). Reduced growth factor responses in vascular smooth muscle cells derived from 12/15-lipoxygenase-deficient mice. Hypertension 41:1294 - 1300.
31. Cai Q, Lanting L, Natarajan R (2004). Growth factors induce monocyte binding to vascular smooth muscle cells: implications for monocyte retention in atherosclerosis. Am J Physiol Cell Physiol 287:707-714.
32. Pinheiro ML, Feres-Filho EJ, Graves DT, Takiya CM, Elsas MI, Elsas

PP, Luz RA (2003). Quantification and localization of platelet-derived growth factor in gingiva of periodontitis patients. J Periodontol 74:323-328.

33. Gospodarowicz D (1990). Fibroblast growth factor. Chemical structure and biologic function. Clin Orthop Relat Res 257:231-248.
34. Cozzolino F, Torcia M, Lucibello M, Morbidelli L, Ziche M, Platt J, Fabiani S, Brett J, and Sternil D (1993). Interferon-alpha and interleukin 2 synergistically enhance basic fibroblast growth factor synthesis and induce release, promoting endothelial cell growth. J Clin Invest 91:2504 - 2512.
35. Walford G, Loscalzo J (2003). Nitric oxide in vascular biology. J Thromb Haemost 1:2112 - 2118.
36. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M, Pinsky DJ (1995). Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 92:4606 - 4610.
37. Baird A, Mormede P, Bohlen P (1985). Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. Biochem Biophys Res Commun 126: 358 - 364.
38. Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberlein TJ, Klagsbrun M (1994). T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by

CD4+ and CD8+ T cells. Proc Natl Acad Sci USA 91:2890 - 2894.

39. Peoples GE, Blotnick S, Takahashi K, Freeman MR, Klagsbrun M, Eberlein TJ (1995). T lymphocytes that infiltrate tumors and atherosclerotic plaques produce heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor: a potential pathologic role. Proc Natl Acad Sci USA 92:6547 - 6551.
40. Prochnau D, Rodel J, Hartmann M, Straube E, Figulla HR (2004). Growth factor production in human endothelial cells after Chlamydia pneumoniae infection. Int J Med Microbiol 294:53-57.
41. Cury JD, Campbell EJ, Lazarus CJ, Albin RJ, Welgus HG (1988). Selective upregulation of human alveolar macrophage collagenase production by lipopolysaccharide and comparison to collagenase production in fibroblasts. J Immunol 14:4306 - 4312.
42. Shapiro SD, Kobayashi DK, Welgus HG (1992). Identification of TIMP-2 in human alveolar macrophages. Regulation of biosynthesis is opposite to that of metalloproteinases and TIMP-1. J Biol Chem 267:13890 - 13894.
43. Tian JY, Sørensen ES, Butler WT, Lopez CA, Sy MS, Desai NK, Denhardt DT (2000). Regulation of no synthesis induced by inflammatory mediators in RAW264.7 cells: collagen prevents inhibition by osteopontin. Cytokine 12(5):450 - 457.
44. Ross HM, Romrell LJ, Kaye GI (1995). Histology: a text and atlas, 3rd ed pp. 107-110.

사진부도 설명

Fig. 1. Nucleotide sequence of the mSLPI cDNA. Nucleotide sequence of the mSLPI cDNA is shown, with the amino acid sequence of the predicted translation product listed below the nucleotide sequence. An asterisk indicates the position of the stop codon. Numbers in plainface refer to the nucleotide sequence, and boldface numbers refer to the amino acid sequence. ····· 27

Fig. 2. Amino acid sequence of mSLPI. Rabbit polyclonal antibody generated from pepteide in box against the mSLPI peptide sequences. ····· 28

Fig. 3. RT-PCR assay of the SLPI and growth factors mRNA. A) SLPI and VEGF, PDGF, bFGF mRNA expression in RAW264.7 cells treated with LPS for control (lane 1), 30 min (lane 2), 60 min (lane 3), 90 min (lane 4), 24 hr (lane 5), and 48 hr (lane 6), respectively. GAPDH was used as an amplification internal control for the RT-PCR assays (S: 100 bp DNA size marker). B) Fold induction was quantified in band intensity by dividing the intensity of each growth factor and SLPI signal to that of control sample. C) Quantification of SLPI mRNA expression in RAW264.7 cells using Real Time-PCR method. SLPI mRNA expression in RAW264.7 cells treated with LPS for control, 30 min, 60 min, 90 min, 24 hr, and 48 hr, respectively. ····· 29

Fig. 4. SLPI protein levels in RAW264.7 cells by LPS treatment. To evaluatethe effect of LPS on SLPI protein expression in RAW 264.7 cells (control, lane 1), we exposed to 100 ng/ml LPS for 30 min, 60 min, 90 min, 24 hr and 48 hr, collected the supernatant

and performed immunoprecipitation. Percent of induction was quantified in the lysates and media by dividing the intensity of SLPI signals to that of control sample (M: medium, L: lysates). 31

Fig. 5. Observation of morphology in RAW264.7 stimulation with LPS. A) Morphology of RAW264.7 cells observed using the phase contrast microscopy. The cells exposed to LPS (100 ng/ml) for control (①) and 30 min (②), 60 min (③) and 90 min (④), 24 hr (⑤), and 48 hr (⑥), respectively. All magnification is x 200. B) SEM analysis of RAW264.7 cells stimulation with LPS. The change of morphology was observed from 30 (②) min after LPS treatmen. Control, (①); 60 min, (③); 90 min, (④); 24 hr, (⑤); 48 hr, (⑥). 32

Fig. 6. Diagram of conclusions. A) mRNA expression of SLPI, VEGF, bFGF, PDGF in RAW264.7 cell after LPS stimulation. B) LPS induces the SLPI gene and protein. After induction of SLPI, secreated SLPI inhibits LPS function and released SLPI may promotes proliferation and migration of neighboring cells through VEGF and PDGF signaling pathway. 33

Fig. 1.

```
  1 gcttctgtcattttcagctctcaggtggttactctgatggcctcatggtcctgcctgaaa
 61 cagaaagtctgccacctacttctgtagcagcaagactcctgttctgtggctaagcttcct
121 gcctgtgcaagagccacagggaggggccaaatgcatgccactggggccacgcctcctggt
181 aaagacataaatagtgatcctcgggactggtcatcagagctcccctgccttcaccATGAA
  2                                                          M  K
241 GTCCTGCGGCCTTTTACCTTTCACGGTGCTCCTTGCTCTGGGGATCCTGGCACCCTGGAC
 22  S  C  G  L  L  P  F  T  V  L  L  A  L  G  I  L  A  P  W  t
301 TGTGGAAGGAGGCAAAAATGATGCTATCAAAATCGGAGCCTGCCCTGCTAAAAAGCCTGC
 42  V  E  G  G  K  N  D  A  I  K  I  G  A  C  P  A  K  K  P  A
361 CCAGTGCCTTAAGCTTGAGAAGCCACAATGCCGTACTGACTGGGAGTGCCCGGGAAAGCA
 62  Q  C  L  K  L  E  K  P  Q  C  R  T  D  W  E  C  P  G  K  Q
421 GAGGTGCTGCCAAGATGCTTGCGGTTCCAAGTGCGTGAATCCTGTTCCCATTCGCAAACC
 82  R  C  C  Q  D  A  C  G  S  K  C  V  N  P  V  P  I  R  K  P
481 AGTGTGGAGGAAGCCTGGGAGGTGCGTCAAAACTCAGGCAAGATGTATGATGCTTAACCC
102  V  W  R  K  P  G  R  C  V  K  T  Q  A  R  C  M  M  L  N  P
541 TCCCAATGTCTGCCAGAGGGACGGGCAGTGTGACGGCAAATACAAGTGCTGTGAGGGTAT
122  P  N  V  C  Q  R  D  G  Q  C  D  G  K  Y  K  C  C  E  G  I
601 ATGTGGGAAAGTCTGCCTGCCCCCGATGTGAGcctgatccctgacattggcgccggctct
131  C  G  K  V  C  L  P  P  M  *
661 ggactcgtgctcggtgtgctctggaaactacttccctgctcccaggcgtccctgctccgg
721 gttccatggctcccggctccctgtatcccaggcttggatcctgtggaccagggttactgt
781 tttaccactaacatctccttttggctcagcattcaccgatctttagggaaatgctgttgg
841 agagcaaataaataaacgcattcatttctctatgcaaaaaaaaaaaaaaa aaaa
```

Fig. 2.

NH2- **Signal Peptides Region(1-25)** **Secreted Peptides Region**

MKSCGLLPFTVLLALGILAPWTVEGGKNDAIKIGACPAKKPAQC
LKLEKPQCRTDWECPGKQRCCQDACGSKCVNPVPIRKPVWRKPGRCV
KTQARCMMLNP PNVCQRDGQCDGKYKCCEGICGKVCLPPM

-COOH

Fig. 3.

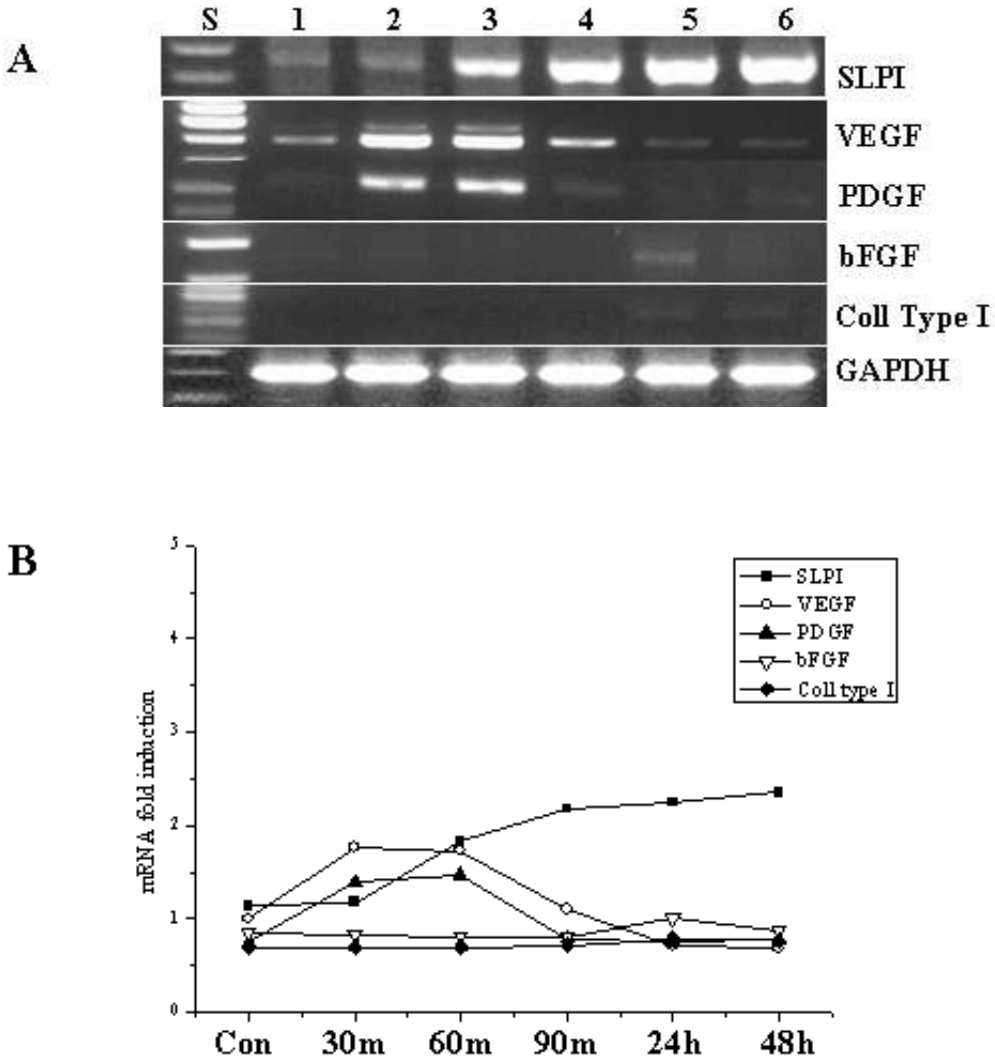

A
S
1
2
3
4
5
6
SLPI
VEGF
PDGF
bFGF
Coll Type I
GAPDH
B
mRNA fold induction
0
1
2
3
4
5
SLPI
VEGF
PDGF
bFGF
Coll type I
Con
30m
60m
90m
24h
48h

Fig. 3. (continued)

C

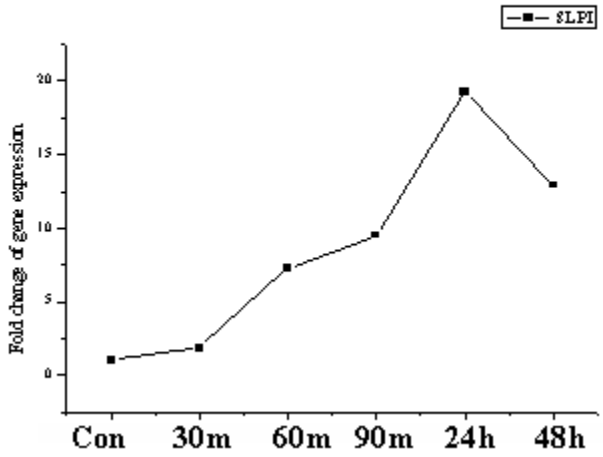
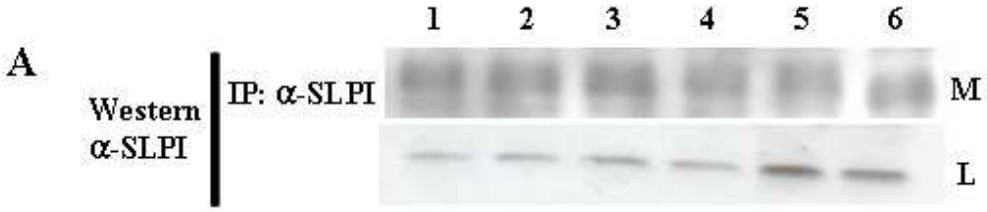


Fig. 4.


A
1
2
3
4
5
6
Western
α-SLPI
IP: α-SLPI
M
L

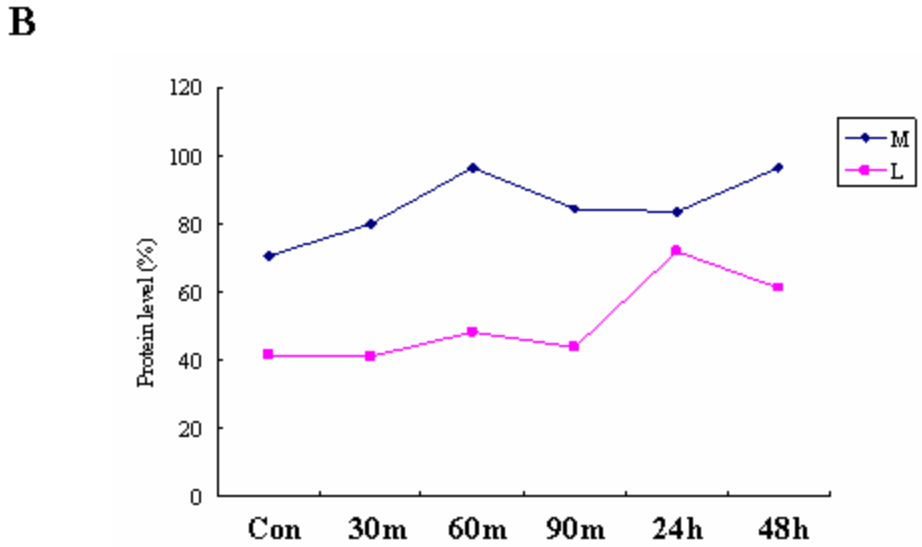
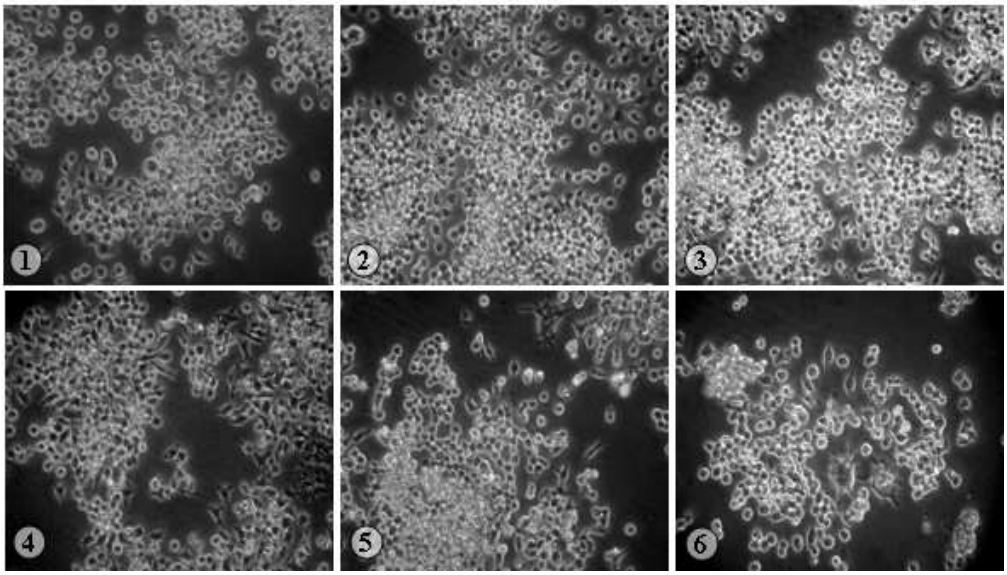

B
120
100
80
60
40
20
0
Protein level (%)
M
L
Con
30m
60m
90m
24h
48h

Fig. 5.

A



B

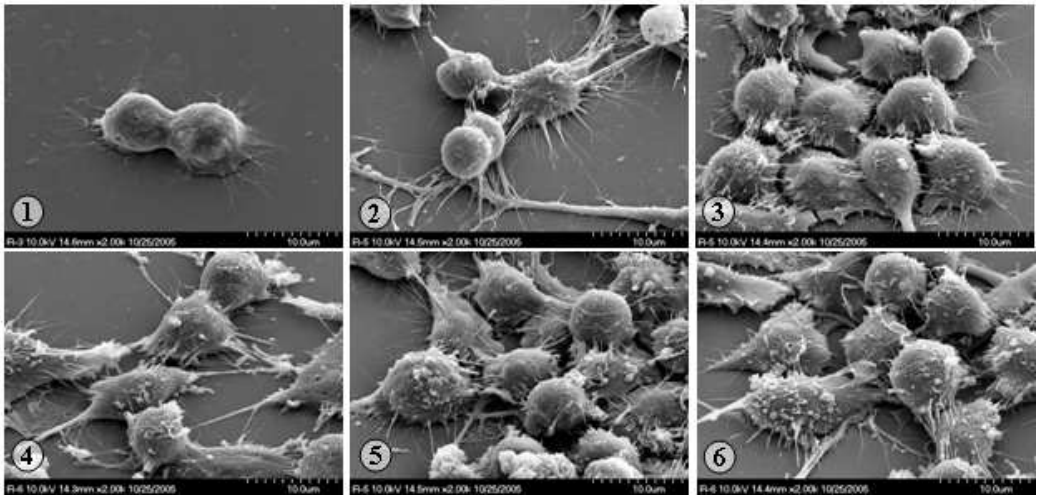
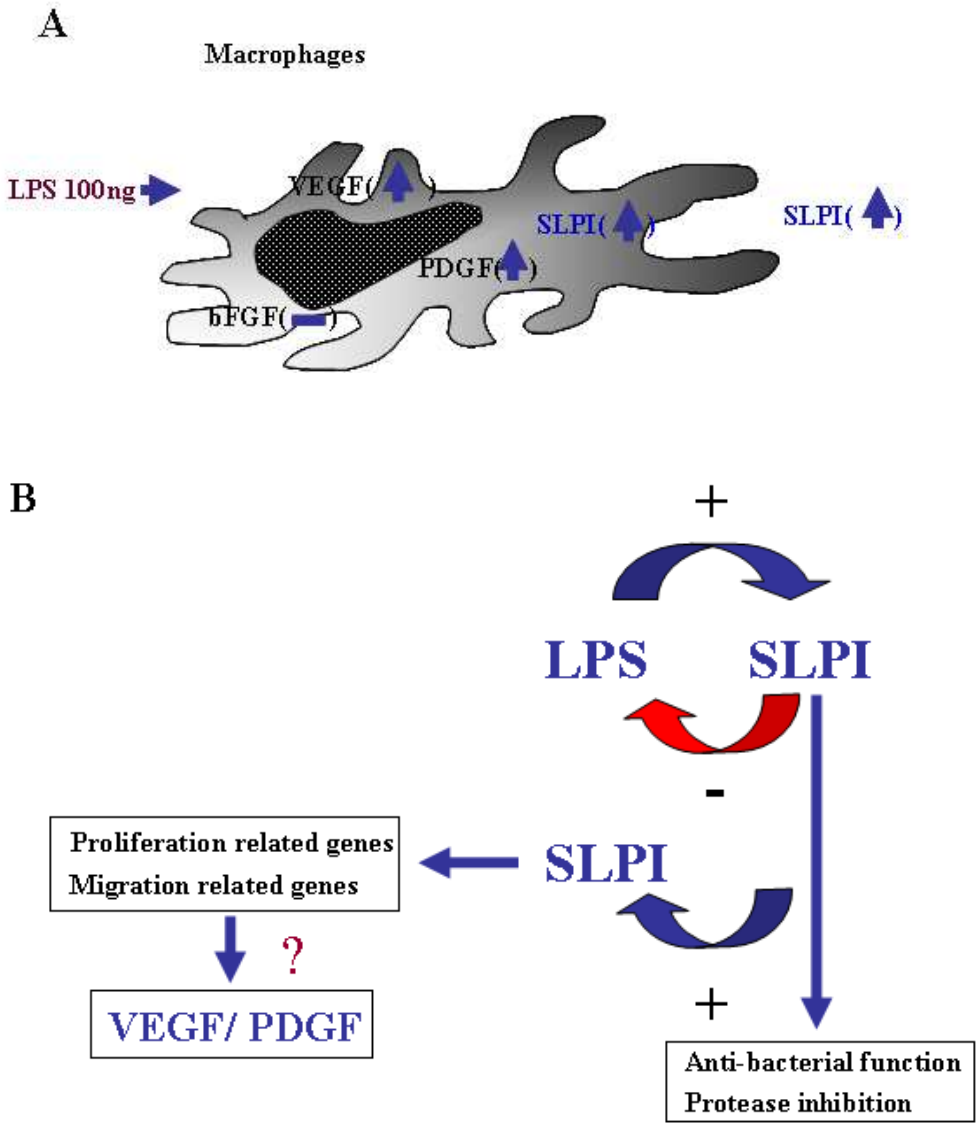


Fig. 6.


A
Macrophages
LPS 100ng
VEGF( )
SLPI( )
SLPI( )
PDGF( )
bFGF( )
B
+
LPS
SLPI
-
Proliferation related genes
Migration related genes
SLPI
?
VEGF/ PDGF
+
Anti-bacterial function
Protease inhibition

저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20057482	과 정	박 사
성 명	한글 : 손 욱 희 한문 : 孫 旭 熙 영문 : Son, Wook-Hee				
주 소	전남 목포시 상동 854-7 굿모닝치과				
연락처	E-MAIL : heaveng@hanmail.net				
논문제목	한글 : 대식세포주에서 박테리아성지질다당류 자극에 의한 분비백혈구단백분해효소억제제와 성장인자들의 발현 영문 : Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and growth factors induced by lipopolysaccharide stimulation in RAW264.7 macrophages				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대( )

2007년 8월 일

저작자 : 손 욱 희 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하